

- CARLOS ALBERTO TEIXEIRA PETIZ -

DEGRADAÇÃO SEQUENCIADA TIPO SMITH EM GALACTANO DE
MASSA DE OVOS DE AMPULLARIUS sp. (Recife Pe.)

Tese de Mestrado Apresentada
ao Departamento de Bioquímica
da Universidade Federal do
Paraná.

- 1977 -

A MEUS PAIS

TRABALHO ORIENTADO PELO PROF. DR. JOSÉ HAZENCLEVE DUARTE

BANCA EXAMINADORA:

PROF. JOÃO BATISTA CHAVES CORRÊA

PROF. LUIZ RODOLFO TRAVASSOS

PROF. LUIZ RAMON MARECHAL

Curitiba, 16 de Maio de 1977

- Í N D I C E -

RESUMO.....	13
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODO.....	18
Métodos Gerais.....	18
Isolamento e Purificação do Galactano.....	19
Hidrólise Ácida do Polissacarídeo.....	21
Consumo de Periodato e Ácido Fôrmico Liberado.....	21
Análise Tipo Smith dos Grupos Terminais.....	22
Metilação dos Galactanos.....	23
Metanólise do Galactano.....	23
Degradação sequenciada tipo Smith.....	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
TABELA I.....	31
TABELA II.....	32
TABELA III.....	33
TABELA IV.....	34
TABELA V.....	35
NÚMERO DE DEGRADAÇÕES - Fig. 1	36
NÚMERO DE DEGRADAÇÕES - Fig. 2	36
CONCLUSÃO.....	37
AGRADECIMENTOS.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

A fração de polissacarídeo isolada da massa de ovos de *Ampullarius* sp. foi fracionada em dois polímeros (F.A e F.B), com base quartenária (brometo de hexadeciltrimetilamonio). Estes polímeros não apresentavam, em seus dados analíticos, diferenças apreciáveis. Ambos eram formados de D-galactose e ácido pirúvico, numa relação molar de 13:1 - (F.A) e de 12:1 (F.B). A análise de metilação dos polímeros, na sequência do processo degradativo tipo Smith, mostrou um aumento crescente da percentagem de 2, 4, 6-tri-, e uma diminuição da percentagem de - 2, 3, 4, 6-tetra- e de 2, 4-di-, e ainda uma grande variação na quantidade de 2, 3, 4-tri-O-metil-D-galactose. As unidades de açúcar no polímero, que dão origem a 2, 3, 4, 6-tetra- e 2, 3, 4-tri-O-metil-D-galac-tose são destruídas na etapa subsequente do processo degradativo.

A percentagem molar de 2, 6-di-O-metil-D-galactopirranose, observada nos produtos de metanólise dos polímeros degradados (F.D-1, F.D-2 e F.D.-3 metilados), era idêntica a de ácido pirúvico nestas frações. Estes dados sugerem, que o ácido pirúvico esteja ligado a uma configuração cetálica envolvendo os carbonos C-3 e C-4 de unidades do polímero - (F.B) mas numa conformação não totalmente esclarecida. Pelos dados de metilação, as unidades de D-galactose ligadas a ácido pirúvico não podem ser consideradas como grupos terminais não redutores do polímero - (F.B).

Os dados de degradação sequenciada tipo Smith obtidos do gala-ctano de *Ampullarius* sp., sugerem para este polímero uma cadeia linear-principal do tipo $\beta(1\rightarrow3)$ de onde partem cadeias ramificadas, as mais diversas.

- I N T R O D U Ç Ã O -

Em 1931, May (1) demonstrou a presença de um polissacarídeo/na massa de ovos de *Helix pomatia*, o qual recebeu a denominação de galactogênio, por ser formado apenas de unidades de galactoses. As investigações posteriores de May e Weinland (2) sôbre galactogênio de massa de ovos de *Helix pomatia*, demonstraram que este polímero era constituído - de D- e L-galactose numa relação de 6:1. Por hidrólise ácida parcial, foi isolado uma série homóloga de oligossacarídeo de D-galactose, tipo β -D-(1 \rightarrow 3) (di, tri e pentassacarídeo) além de um dissacarídeo do tipo β -D-(1 \rightarrow 6) (3,4). Semelhantes resultados foram obtidos por Honda (5) nos produtos de hidrólise ácida parcial do galactano de *Megalobulinus paraguensis*.

Feijó e Duarte (6) investigando o polissacarídeo de massa de ovos de *Ampullarius* sp. (Morretes, Pr.) verificaram que este polímero - apresentava característica química que o diferenciava dos galactanos - até então investigados em massa de ovos de molusco. O heteropolissacarídeo investigado por estes autores, é um fucogalactano (2 moles por % de L-fucose) o qual apresentava uma preponderância de uma alta proporção de ligação do tipo β (1 \rightarrow 3) sobre β (1 \rightarrow 6), além de uma alta proporção/ de ligação do tipo (1 \rightarrow 2), o qual não fora ainda assinalada em polímeros de moluscos.

A fração de polissacarídeo isolada da glândula de albúmen de *Ampallarius* sp. (Recife Pe.) por Duarte (7) foi fracionada em dois polímeros ácidos, com auxílio de base quartenária. Es es polímeros eram - formados de unidades de D-galactose, grupo acetil e ácido pírúvico -

(1-carboxietilidenil), numa relação de 13:5:1). Recentemente Borges (8) investigando um polissacarídeo ácido isolado da glândula de albúmen de *Ampullarius* sp. (Santo Antonio da Platina Pr.) verificou que este polímero era formado de D-galactose e ácido pirúvico (1-carboxietilidenil) numa relação de 20:1. Ao contrário dos polímeros anteriormente investigados, em moluscos do gênero *Ampullarius*, esse polímero não continha L-fucose nem grupo acetil.

Embora, atualmente, não seja aceitável uma estrutura única para os galactanos como previra O'Colla (9), é provável que do ponto de vista estrutural, estes polímeros apresentem algumas características químicas em comum ao Filum, havendo ainda possibilidades de diferenciação quanto ao gênero. Neste particular, foi verificado que açúcar ligado a piruvato é um componente bastante comum dos polissacarídeos de Ampullarídeos. (7,8). Feijó (10) reestudando, recentemente, o fucogalactano de *Ampullarius* sp. (Morretes, Pr.) comprovou também a presença de ácido pirúvico neste polímero. Os dados atuais não permitem, contudo, concluir que, o ácido pirúvico ligado a unidade de D-galactose, seja uma característica exclusiva dos galactanos do gênero *Ampullarius*, em virtude do número restrito de espécies de moluscos, até então estudados e sua abundância pode ser mais geral do que a julgada anteriormente, como ocorreu com os cetais do ácido pirúvico e ácido láctico (eterificado) em polissacarídeos de bactérias (11,12).

Os dados de metilação dos polissacarídeos, nas diversas espécies de moluscos já investigados (13,14,6,7,8), indicam que estes polímeros são altamente ramificados contendo, em adição, cadeias lineares / do tipo $\beta(1\rightarrow3)$ ou $\beta(1\rightarrow6)$.

Segura e Duarte (15), na sequência de processos degradativos (Degradação Sequenciada tipo Smith) do galactano de *S. oblongos*, demonstraram uma concentração crescente de ligações glicosídicas tipo $\beta(1\rightarrow3)$, linearmente dispostas. Estes dados, em parte se contrapõem aqueles dos

modelos moleculares propostos para o galactano de *Helix pomatia* e *B.glabrata* (9,16,17).

Afim de comprovar se os dados de Segura e Duarte são comuns a galactanos de outras espécies de moluscos, foi planejado investigar por técnicas de metilação, os polímeros obtidos nas diversas etapas da degradação sequenciada tipo Smith, do galactano isolado da massa de ovos de *Ampullarius* sp. (Recife Pe.).

Como Duarte (7) havia sugerido que o ácido pirúvico se encontrasse ligado ao galactano da glândula de albúmen deste molusco, na forma de um cetel, envolvendo provavelmente, uma ligação do tipo 3,4-O-(1-carboxietilideno) é possível que pelo estudo de metilação dos polímeros degradados, (degradação sequenciada tipo Smith) venha comprovar esta hipótese.

A eletroforese dos polissacarídeos foi realizada em papel acetilado (Cellogel) segundo o método de Dudman e Bishop (18) usando-se câmara de imersão de Chemetrom e fonte estabilizadora de eletroforese da FANEM Ltda., São Paulo. A rotação ótica foi determinada em Polarímetro Perkin Elmer, modelo 141, à temperatura de 25°C. A cromatografia em fase gasosa (G.L.C.) dos açúcares acetilados e metilados foi realizada em cromatógrafo F&M, modelo 810-R-12 (ionização de chama) utilizando-se, - hélio como gás de arraste (40 ml/min), detector e câmara de injeção na temperatura de 230° e 200° C respectivamente, e as colunas a) 14% (p/p) de LAC-4R-886 sobre Chrom w (D.M.S.C.) de 80-100 mesh (coluna 100 x 0,4 cm d.i.) à 162°C. b) 3% de OV-225 sobre Chrom Q de 100-120 mesh (coluna 200 x 0,2 cm d.i.) à 170°C e temperatura programada de 145° - 180°C, 4°C/min. A coluna (a) foi utilizada para análise quantitativa dos produtos metilados (20), e as áreas dos picos foram calculadas por triangulação, os tempos de retenção (T) foram relacionados com o metil 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-glucopiranosídeo e com padrões de açúcares metilados (13). Para os derivados acetilados (alдитóis acetato) (19) foi usada a coluna (b), sendo que os valores quantitativos e (T) foi referido ao L-arabinitol-penta-acetato. As áreas dos picos também foram calculadas - por triangulação, A cromatografia em papel (c.p.) foi realizada pelo método descendente em papel Whatman nº 1 e 4 com os seguintes sistemas-de solventes (v/v): c) benzeno, n-butanol, piridina, água 1:5:3:3 (fase superior); d) n-butanol, etanol, água 9:3:3; e) butanona, água, amônia 200:17:1 (fase superior). Os açúcares foram visualizados com nitrato de prata (I) (21) e cloridrato de p-anisidina (II) (22). A migração/dos açúcares livres foi relacionada a da D-galactose (Rgal.). Para a cromatografia em camada delgada (t.l.c.) foi usado placas de sílica gel

(Merck) nos seguintes sistemas de solventes (v/v); f) benzeno, acetato-de etila, metanol 6:3:3; g) benzeno, etanol, água, ácido acético 200:47:15:1 (fase superior); h) benzeno, metanol 9:1. O material nas placas, foi visualizado com solução a 5% de ácido sulfúrico em metanol, seguido de aquecimento em estufa a 150°C. A dosagem de açúcar total foi feita pelo método do fenol-ácido sulfúrico (23), e os açúcares redutores pelo método de Somogyi iodométrico (24). As seguintes substâncias foram dosadas: proteínas, pelo reativo de Folin-Ciocalteu, segundo Lowry et al. (25); formaldeído, pelo processo de Vaskowsky e Isay (26); ácido urônico, pelo método do carbazol (27,28); fosfato, pelo método de Chen et al. (49); sulfato, pelo método da benzidina (29); hexosamina, pelo método de Boas (30); ester metoxil, pelo reativo de Hinton, segundo Schultz (31); ácido siálico, segundo processo de Svennerholm (32) e Warren (33); acetil, pelo método de McComb e McCready (34) Tabela I. Os açúcares foram acetilados pelo método convencional, usando anidrido-acético-piridina (1:1 v/v) durante 4 horas em refluxo a 100°C (35). Em seguida a mistura de reação foi tratada com água (0 - 2°C), e os açúcares acetilados foram extraídos com clorofórmio, sendo que a piridina residual foi eliminada com tratamento ácido.

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO GALACTANO

Os moluscos *Ampullarius sp.*, utilizados no presente trabalho, foram coletados no Açude Dois Irmãos, Apipucos, Recife, Pe. Os moluscos foram mantidos em aquários e alimentados com algas.

A massa de ovos (135 unidades) foi coletada das paredes dos aquários durante o período de até 12 horas após a oviposição, e conservadas em acetona (0 - 2°C). Em seguida o material coletado, foi triturado em liquidificador em presença de acetona (3 vezes) e centrifugado. O resíduo foi seco à temperatura ambiente, e em seguida, tratado -

com n-butanol saturado com água em refluxo durante 5 horas a 100°C. O resíduo obtido após filtração foi tratado com uma mistura de clorofórmio - metanol 2:1 (v/v) durante 12 horas, à temperatura ambiente. Após filtração, o resíduo foi tratado novamente com acetona (3 vezes) e seco a temperatura ambiente. O pó cetônico (58g) foi desproteínizado com enzima proteolítica (Protease tipo VII da sigma), 150 mg (3 vezes de 50mg) em 500 ml de uma solução de acetato de amônia 0,2 M, pH 8,5. Esta solução continha cloreto de cálcio (0,005 M) e foi mantida a 37°C durante 10 dias, em atmosfera de Tolueno. O sistema de reação, após este período, foi centrifugado (resíduo desprezado) e o sobrenadante foi dialisado contra água corrente durante 24 horas. Após a dialise, a solução - contendo o polissacarídeo foi centrifugada novamente e o sobrenadante foi tratado com etanol (3 volumes) e centrifugado. Numa tentativa de eliminar vestígios de proteínas no polímero, a solução do polissacarídeo foi tratada com fenol 80% numa relação 5:1(v/v), durante 60 minutos, e em seguida, centrifugada. O sobrenadante foi tratado com etanol (5 volumes) e o resíduo obtido foi desproteínizado pelo processo Sevag (3 vezes) (36). A fase aquosa deste processo, foi tratada com etanol (3 volumes) e o resíduo obtido foi seco com acetona (3 vezes). Após estes tratamentos não foi detectado proteínas no resíduo. Este polissacarídeo foi submetido ao processo de fracionamento, utilizando-se bases - quartenárias de amônia (brometo de hexadeciltrimetilamonio, cetavlon da Sigma), seguido de precipitação em presença de tampão borato (13). Desse modo foram obtidos dois polissacarídeos, por precipitação fracionada com cetavlon, um em pH 7,0 (F.A.) $[\eta]_D^{25} + 0,40$ (0,66 em água), e outro em pH 8,5 (F.B.) $[\eta]_D^{25} + 0,44$ (0,69 em água). O rendimento destas frações, relativo ao peso seco do pó cetônico (58g) foi de 2,9% para F.A. (1,6g), e de 3,8% para o F.B. (2,2g).

HIDRÓLISE ÁCIDA DO POLISSACARÍDEO

Uma amostra do polissacarídeo (F.A. e F.B. 10mg) foi hidrolizada com ácido sulfúrico 1N (1 ml) durante 4 horas a 100°C (37) em ampola (fechada em bico de Busen). O hidrolizado ácido apresentando - rotações óticas de $[\alpha]_D^{25} + 79,7$ (0,7 em água) e de $[\alpha]_D^{25} + 79,5$ (0,6 em água) para F.A. e F.B. respectivamente, foi tratado com carbonato de bário (pH 4,5), seguido de centrifugação e concentração (evaporador rotatório à vácuo). Uma alíquota do hidrolizado foi analisada em c.p. - descendente (solvente c) e os açúcares foram visualizados com os reagentes I e II. Outra alíquota do hidrolizado foi tratada com boridreto de sódio, à temperatura ambiente, durante 12 horas. O excesso do agente redutor foi eliminado por tratamento com ácido acético 2N. A solução foi desionizada através de resina de Dowex 50 X 8 (200-400mesh) forma H^+ , e o eluato foi concentrado até a secura, o ácido bórico residual foi removido por tratamento sucessivo com metanol anidro e destilação à vácuo, (38). Os alditóis foram acetilados (anidrido acético - piridina), eos alditóis acetatos obtidos, foram analisados por G.L.C. - (coluna b). Os resultados da c.p. e análise dos alditóis acetatos, demonstraram a presença única de D-galactose, ($R_{gal} - 1,0$, $T - 1,96$).

CONSUMO DE PERIODATO E ÁCIDO FÓRMICO LIBERADO

Uma amostra de cada um dos polissacarídeos F.A. e F. B. (250mg de cada) foi oxidada com m-periodato de sódio 0,05 M (100 ml), na ausência de luz, durante 80 horas a 0 - 2°C. Foram retiradas alíquotas da solução oxidante em diferentes intervalos de tempo, para determinação do consumo de periodato (39), que foi calculado da seguinte maneira:

$$M = \frac{(B - A) \times N \text{ do Tiosulfato de sódio}}{\text{ml da alíquota} \times 2}$$

$$\frac{\text{moles de Periodato}}{\text{moles hexose anidra}} = \frac{\text{Volume total da solução oxidante} \times M \times 162}{\text{g do polissacarídeo} \times 1000}$$

Onde:

M = molaridade da solução oxidante

A = ml de tiosulfato de sódio gastos na titulação da amostra

B = ml de tiosulfato de sódio gastos na titulação do branco

Os moles de periodato/mol de hexose anidra foram extrapolados para o tempo zero. O ácido fórmico liberado nos sistemas de oxidação - foram determinados por titulação em atmosfera de nitrogênio, usando-se/ fenolftaleína como indicador. O cálculo foi feito conforme equação a baixo: (40)

$$\frac{\text{moles de ácido fórmico}}{\text{mol de hexose anidra}} = \frac{\text{ml de NaOH} \times N \text{ do NaOH} \times \text{vol.sol.oxid.} \times 162}{\text{g de polissacarídeo} \times 1000 \text{ ml da amostra}}$$

A F. A. apresentou um consumo de periodato de 0,86 e 0,43 de ácido fórmico, por mol de hexose anidra. Enquanto para F.B. estes valores foram de 0,83 e 0,41 respectivamente.

ANÁLISE TIPO SMITH DOS GRUPOS TERMINAIS

Nas amostras (F.A. e F. B.) anteriormente oxidadas (ver consumo de periodato) foi adicionado etilenoglicol (0,5 ml), durante 30 minutos, seguido de diálise contra água corrente. Em seguida a solução foi tratada com boridreto de sódio (0,5 g) durante 24 horas. O excesso de boridreto foi eliminado com ácido acético 2N, e nova diálise foi realizada. A seguir a solução foi concentrada para 50 ml e uma alíquota - (5 ml) foi concentrada a secura e hidrolizada com ácido sulfúrico 1N a 100°C durante 4 horas. O hidrolizado ácido foi novamente reduzido com boridreto de sódio por 12 horas. A solução foi desionizada em resina - de Dowex 50 X 8 (200 - 400 mesh) forma H⁺, e o eluato, concentrado a vácuo. O ácido bórico residual foi eliminado por tratamento com metanol a nidro (3 ml) seguido de destilação a vácuo (6 vezes). Os alditóis fo ram acetilados como já descrito, e analisados por G.L.C. (coluna b) - (41).

METILAÇÃO DOS GALACTANOS

A uma amostra de cada polissacarídeo (F.A. 50 mg e F.B. 50 mg) dissolvida em água (5 ml) e acetona (5 ml), em agitação constante (agitador magnético), foi adicionado gota a gota, sulfato de metila (1 ml) e/ou hidróxido de sódio 40% (2 ml), durante 3 horas, seguido de agitação por mais 8 horas (42). Após neutralização com ácido sulfúrico (6N até pH 7,0 a 0°C - 2°C), a solução foi dializada contra água corrente por 24 horas e liofilizada. O processo foi repetido por mais três vezes. O material foi suspenso em tetrahydrofurano (5 ml) e tratado com uma mistura de sulfato de metila (0,3 ml) e hidróxido de sódio pulverizado (0,25 g) com agitação constante e a temperatura ambiente por 16 horas (43). A mistura de reação foi neutralizada com ácido sulfúrico (6N até pH 7,0 a 0°C - 2°C) e liofilizada. O processo foi repetido por mais duas vezes. Em seguida o polissacarídeo parcialmente metilado foi solubilizado em dimetilsulfóxido (5 ml) sob agitação constante à 60°C durante uma hora. Após resfriamento, foi adicionado o reagente de Hakomori na concentração de 0,023 eq. de ânion metil-sulfinil (44) em atmosfera de nitrogênio durante 12 horas com forte agitação. Em seguida foi adicionado iodo de metila (0,3 ml) e a mistura da reação permaneceu em agitação por mais 30 minutos. O material foi dialisado em água corrente por 24 horas. O processo foi repetido por mais duas vezes. O rendimento foi de 90% para a F.A. (45 mg) e de 88% para a F.B. (44 mg). Os polímeros após dez metilações, ainda apresentavam pequena absorção na região de grupos hidroxilicos no aspecto de I.V. Entretanto na análise por G.L.C. t.l.c. e (solventes f,g,h) e espectrometria de massa não revelou a presença de mono metil derivado.

METANÓLISE DO GALACTANO

Uma amostra de cada polissacarídeo metilado (F.A. 10 mg e F.B. 10 mg) foi colocada em ampola (fechada em bico de Busen) e tratada em

solução (1 ml) de ácido clorídrico - metanol (5:100) e aquecida à 100°C em estufa durante 6 horas (45). A solução foi neutralizada com carbonato de prata e filtrada em papel de filtro Ederol nº 4 Ø cm = 9 J-C. - Binzer Germany. No filtrado foi passado uma corrente de H₂S e novamente, filtrado. Após concentração à vácuo o resíduo foi dissolvido em - clorofórmio e os derivados metilados foram analisados por G.L.C., utilizando-se a coluna a.

DEGRADAÇÃO SEQUENCIADA TIPO SMITH

O processo de degradação sequenciada tipo Smith, utilizado para o galactano de *Ampullarius* sp. (F.B.) é semelhante aquele desenvolvido neste Departamento, por Segura e Duarte (15) para *S.oblongus*.

O polissacarídeo (1,3 g) foi oxidado com solução de m-periodato de sódio 0,05 M (500 ml) nas condições descritas anteriormente - (ver consumo de Periodato). Após 80 horas de oxidação, a solução contendo o polissacarídeo, foi dialisada contra água corrente (26 horas). O processo de oxidação foi repetido usando-se 250 ml. de periodato, durante 50 horas (consumo 0,02 moles por mol de hexose anidra).

Em seguida, o polissacarídeo oxidado foi reduzido com boridreto de sódio (2,0 g a pH 9,0) durante 48 horas, nas condições descritas/ para a análise tipo Smith dos grupos terminais e após diálise contra - água corrente, o processo de redução foi repetido mais uma vez usando - se 1,0 g de boridreto de sódio durante 24 horas.

O polialcool foi submetido a hidrólise com ácido sulfúrico/ 0,5 M (100 ml), a temperatura ambiente (18°C - 25°C), por 60 horas. Após diálise em água destilada, o material não dialisável (polissacarídeo degradado) foi recuperado e submetido a nova hidrólise com ácido sulfúrico 0,5 M (100 ml) por 30 horas, seguido novamente de diálise com água -

destilada (4 x 250 ml). O material não dialisado foi liofilizado e conservado para posterior degradação. Esta fração recebeu a denominação - de fração degradada 1 (F.D.1).

A solução contendo o material dialisável foi neutralizada - com bicarbonato de sódio (pH 7,0) filtrado e concentrada a vácuo. Uma alíquota deste material foi hidrolisada com ácido sulfúrico como já - descrita, e a análise por c.p. (solvente c) demonstrava apenas a presença de glicerol e D-galactose.

Uma amostra do polissacarídeo (F.D.-1) foi metilada como descrita para a F. A e F. B e os resultados encontram-se na tabela IV. Os dados da análise tipo Smith dos grupos terminais, consumo de periodato/ e ácido fórmico liberado neste polímero se encontram nas tabelas II e III.

O polissacarídeo parcialmente degradado (F.D.-1) foi submetido sequencialmente a uma segunda e terceira degradação como descrito acima, resultando as frações F.D.-2 e F.D.-3. Os dados análíticos destas - degradações se encontram nas tabelas II, III e IV.

Para a dosagem do ácido pirúvico, os polissacarídeos (F.A, - F.B, F.D.-1, F.D.-2, F.D.-3, 10 mg de cada) foram hidrolisados com 3 ml de ácido oxálico 0,04N, durante 4 horas, a 100°C, em ampola fechada. - Após neutralização com carbonato de cálcio, o hidrolisado foi centrifugado, e o sobrenadante completado o volume para 10 ml com água destilada . O cetoácido foi dosado espectrofotometricamente com a enzima Desidrogenase Lactica de músculo de coelho, tipo B da Sigma, com o seguinte sistema de incubação: Tampão K_2HPO_4 / KH_2PO_4 0,1 M pH 7.4 0,5 ml, 5 λ da enzima diluída 1:20 com Tampão Fosfato de Potássio 0,1 M pH 7.4, 0,15 umoles de NADH, 0,3 ml do material mais água destilada q.s.p. 1 ml. (46, 47, 48 tabela V).

A fração de polissacarídeo isolada da massa de ovos de *Ampul-larius* sp. (Recife, Pe.) foi subdividida em dois polímeros ácidos (F.A.= 2,86g % e F.B=3,8g %) numa relação constante de 0.75:1. A eletroforese em papel acetilado (tampão borato, pH 9,0) demonstrou: que, as frações- F.A e F.B se comportavam de maneira homogênea, ou pelo menos não eram - dissociadas nas condições do experimento. Ambos os polímeros eram for- mados de unidades de D-galactose (F.A. 93,1 moles % e F.B = 92,2 moles%) e ácido pirúvico (F.A.=6,9 moles % e F.B=7,75 moles %, calculado na for- ma de 1-carboxietilidenil). Estes dados indicam uma relação de D-galac- tose: ácido pirúvico de 13:1 e 12:1, nas frações F.A e F.B respectivamen- te.

O mecanismo de fracionamento destes polímeros ácidos por in- termédio de base quartenária em diferentes pH (pH 7,0 e 8,5) não é de fá- cil comprovação. Duarte (7) baseando-se em modelos moleculares, sugeriu/ que a formação de um acetal do ácido pirúvico, com os carbonos C-4 e C-6 ou C-3 e C-4 das unidades de D-galactose das frações F.A e F.B , o que envolveria um equilíbrio entre a carboxila livre do ácido pirúvico e sua forma de lactona. Os polímeros contendo ácido na forma de lactona, não formariam inicialmente, complexo com Cetavlon em pH 7,) , mas seriam, - posteriormente, precipitados em pH 8,5 , na forma de complexo açúcar-ácido bórico-cetavlon.

Uma hipótese mais complexa foi surerida para este fracionamen- to, envolvendo também a formação cetálica do complexo ácido pirúvico-açú- car, o qual estaria numa configuração favorável ou não, a formação de - lactona. Esta hipótese também é demonstrável em modelos moleculares.

Não foram encontradas diferenças apreciáveis entre as frações F.A e F.B , do ponto de vista de consumo de periodato (F.A=0,86 e F.B = 0,83 moles de periodato/moles de hexose anidra) e de ácido fórmico liberado (F.A = 0,43 e F.B = 0,41 moles de ácido fórmico/moles de hexose anidra). Os dados de metilação de ambas estas frações são bastante semelhantes, conforme demonstram os dados da tabela IV. O mesmo ocorre com os resultados, da análise tipo Smith dos grupos terminais (Ver tabela II). Os dados de rotação ótica, bem como, os de I.V. são também muito semelhantes e indicativos de 3 anomericidade em ambos os polímeros. Estes dados se ajustam muito bem, com a hipótese de semelhança estrutural para ambos os polímeros F.A e F.B, os quais foram, provavelmente, separados com base quartenária, por um dos mecanismos anteriormente discutidos.

Diante dessas indicações, foi escolhida apenas a fração F.B como material de estudo para a degradação sequenciada tipo Smith por ser a mais abundante.

Vale ressaltar que as frações F.A e F.B isoladas da massa de ovos de *Ampullarius* sp. (Recife, Pe.) diferem em alguns aspectos daqueles investigados por Duarte (7) na glândula de albúmen do mesmo molusco, como na ausência de grupo acetil e de ligação glicosídica do tipo (1→2). A remoção de unidades de D-galactose com interligação do tipo (1→2), coincidente com a primeira etapa do processo de degradação enzimática do polímero, provavelmente é uma indicação de que essas unidades de hexose estejam distribuídas pela periferia da molécula, pois, no caso contrário - haveria diferenças acentuadas entre os dados de metilação dos polímeros/ de massa de ovos (tabela IV) e dos da glândula de albúmen (7).

O decrescente consumo de periodato e ácido fórmico liberado - das diversas frações (F.D.-1, F.D.-2, F.D.-3) obtidas na sequência do processo degradativo (tabela II) é bastante concordante com a diminuição do glicerol, observado na análise tipo Smith de grupos terminais (tabela III) para as mesmas frações do polímero. Estes dados indicam que houve/

uma diminuição do grau de ramificação da molécula, no decorrer do processo degradativo empregado, acompanhado de uma elevada proporção de unidades de D-galactose com ligações glicosídicas não suscetíveis a oxidação/ com periodato, como ocorre com as ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 3), e com as unidades de D-galactose que estejam ligadas a piruvato numa configuração que envolva o carbono C-3 dessas unidades.

De fato, os resultados das metilações (tabela IV) demonstram - que houve uma diminuição concomitante dos grupos terminais não redutores e das unidades de ramificação dos polímeros, na sequência do processo degradativo, a qual foi acompanhada por um aumento acentuado da percentagem de 2,4,6-tri-O-metil-D-galactose. Os dados da tabela IV, também indicam, que as unidades de açúcar do polímero que dão origem ao 2,3,4,6- tetra e 2,3,4-tri-O-metil-D-galactose, são eliminadas na fase seguinte do processo degradativo, por um mecanismo semelhante ao descrito por Segura e Duarte para o galactano de *S.oblongus* (15).

A análise de metilação das frações F.D.-1, F.D.-2, F.D.-3 (tabela IV), demonstra que houve um aumento crescente de 2,6-di-O-metil- β -D-galactopiranoose, coincidente com o aumento quantitativo de ácido pirúvico observado nessas frações (tabela V), Fig. 1 e Fig. 2).

Em resumo, os dados analíticos de degradação sequenciada tipo Smith do galactano de *Ampullarius sp.*, são muito semelhantes àqueles obtidos por Segura e Duarte (15), para o galactano de *S.oblongus*, exceto - no que concerne ao 2,6-di-O-metil- β -D-galactopiranoose. Estes fatos também indicam que os galactanos de *S.oblongus* e *Ampullarius sp.* (Recife, Pe.) apresentam uma característica estrutural em comum, qual seja, uma cadeia - linear principal do tipo β (1 \rightarrow 3), de onde partem cadeias ramificadas, as mais diversas.

A presença de ácido pirúvico em polissacarídeo de molusco, - foi observada pela primeira vez por Duarte (7) em galactano isolado da

glândula de albúmen de *Ampullarius* sp. (Recife, Pe.). A configuração cetálica do ácido pirúvico na fração F.B foi indicada pela análise em I.V. que demonstrou forte absorção em 6,2 u(ion carboxílico) e em 8,5u e 9,4u (típicas de cetál) (50).

Duarte (7) em seu trabalho envolvendo configuração do ácido - pirúvico, demonstrou que este ceto-ácido no galactano investigado, não estava ligado as unidades deste polímero por ligações do tipo 4,6-o- (1-carboxietilideno). Suas conclusões foram faseadas na ausência de 1,3-o -(1-carboxietilideno)-eritritol, ou de eritritol livre nos produtos de hidrólise dos polímeros oxidados (Na IO_4) e reduzidos (Na BH_4).

Baseando-se nestes dados, Duarte (7) sugeriu que a ligação - cetálica do ácido pirúvico no galactano investigado, envolvesse as hidroxilas dos carbonos C-3 e C-4, de unidades terminais não redutoras do polímero. A presença de 2,6-di-O-metil-D-galactopiranosose, nos produtos - de metanólise do galactano metilado, serviu de subsidio para esta hipótese configuracional.

O mecanismo de formação do 2,6-di-O-metil-D-galactopiranosose , para quando a ligação glicosídica envolvesse as hidroxilas dos carbonos/ C-3 e C-4 das unidades do polímero, não é de fácil percepção. Entretanto este mecanismo é explicado no fato de que a ligação cetálica do ácido pirúvico no polímero é suscetível a hidrólise ácida e resistente ao tratamento com base (51). Deste modo o ácido pirúvico é estável aos processos de metilação, (meio alcalino) mas é removido por metanólise (52).

Os coeficiente angulares das retas ajustadas pelo método dos mínimos quadrados (Fig. 1 e 2), indicam que o aumento crescente de ácido pirúvico nos polímeros (F.D.-1, F.D.-2 e F.D.-3) obtidos na sequencia do processo degradativo tipo Smith, é acompanhado por um aumento correspondente de 2,6-di-O-metil-D-galactopiranosose, nos produtos de metanólise - desses polímeros metilados (tabela IV e V).

Estes dados confirmam a hipótese configuracional proposta anteriormente, por Duarte (7).

Durante o processo degradativo, a configuração cetálica do ácido pirúvico, impediu a oxidação do polímero em vários pontos da molécula. O ácido pirúvico se comportou como uma substância marcadora dos polímeros degradados. Este fato pode ser útil para se acompanhar outros tipos de degradação, como a enzimática. De fato, pela análise mais detalhada dos dados da tabela V e Fig. 1 e 2 foi possível se calcular teoricamente a percentagem de polissacarídeo não degradado, bem como a percentagem de piruvato eliminado (material dializável) durante as diversas fases do processo degradativo. Estes dados foram confirmados experimentalmente.

Ao contrario do que Duarte (7) propos, as unidades de D-galactose ligadas a ácido pirúvico, não se encontram nas extremidades não reductoras do polímero, mas estão ligadas a certos pontos da molécula de maneira ainda obscura.

Os dados de metilação, embora, indiquem um tipo c^onfiguracional para a ligação cetálica envolvendo o ácido pirúvico, a sua configuração absoluta ainda não foi estabelecida.

T A B E L A I

ANÁLISE QUÍMICA DOS GALACTANOS OBTIDOS DA MASSA DE OVOS DE *Ampullarius* sp. (Recife, Pe)

C O M P O N E N T E S		
	F. A.	F. B.
POLISSACARÍDEO	81.8	80.8
ÁGUA ^a	7.4	9.0
CINZA ^b	7.2	6.1
ÁCIDO PIRÚVICO	3.6	4.1
PROTEINA	nd ^c	nd
ÁCIDO URÔNICO	nd	nd
FOSFATO	nd	nd
HEXODAMINA	nd	nd
SULFATO	nd	nd
ÁCIDO SIÁLICO	nd	nd
ACETIL	nd	nd
ESTERMETOXIL	nd	nd
T O T A L	100.0	100.0

a - teor de água determinado a 105°C até peso constante

b - cinza determinada a 400°C até peso constante

c - n.d. não detectado

T A B E L A II

DEGRADAÇÃO SEQUENCIADA TIPO SMITH DO GALACTANO. (F.B.) OBTIDO DE MASSA DE OVOS DE *Ampullarius sp.* (Recife, Pe)

DEGRADAÇÕES	POLÍMERO ^a % g		MOLES DE PERIODATO/ MOL DE HEXOSE ANIDRA	MOLES DE ÁC. FÓRMICO/ MOL DE HEXOSE ANIDRA	RELAÇÃO PERIODATO:ÁC.FÓRMICO_	
ORIGINAL (F.B.)	1.32	100	0.83	0.41	2.0:1	32
PRIMEIRA (F.D.-1)	0.60	45	0.82	0.34	2.4:1	
SEGUNDA (F.D.-2)	0.29	22	0.51	0.24	2.1:1	
TERCEIRA (F.D.-3)	0.04	3	0.35	0.17	2.1:1	

a - Dosado pelo método fenol ácido-sulfúrico (23)

T A B E L A III

ANÁLISE TIPO SMITH DOS GRUPOS TERMINAIS POR G.L.C. DOS POLÍMEROS ORIGINAIS E PARCIALMENTE DEGRADADOS^a

ALDITOL ACETATO	(T) ^b	FRAÇÕES				
		F.A	F.B.	F.D.-1	F.D.-2	F.D.-3
		MOLES POR %				
GLICEROL	0.18	43.0	41.0	35.4	17.1	10.0
DULCITOL	2.4	57.0	59.0	64.6	82.9	90.0

a - Polímeros (F.D.-1, F.D.-2, F.D.-3) obtidos nas diversas etapas da degradação sequenciada tipo Smith da F.B

b - Relativo ao do L - arabinitol-penta-acetato

T A B E L A IV

ANÁLISE POR G.L.C. DOS PRODUTOS DE METANÓLISE DOS POLÍMEROS APÓS DEGRADAÇÃO SEQUENCIADA TIPO SMITH

o-metil- <u>D</u> -galactosideo	VALORES DE (T) ^a	FRAÇÕES				
		F.A	F.B	F.D.-1	F.D.-2	F.D.-3
		MOLES POR %				
2,3,4,6 - tetra -	2.0	38.4	37.2	15.1	12.9	11.1
2,3,6 - tri -	4.0fr 6.6fr	1.5	1.6	-	-	-
2,4,6 - tri -	5.1m 6.0f	9.5	10.8	36.7	47.8	51.8
2,3,4 - tri -	9.8	5.2	5.4	22.2	10.7	8.6
2,6 - di -	13.0f 16.2fr 19.0fr	6.9	7.7	10.8	15.7	17.3
2,4 - di -	25.6m 30.0f	38.5	37.3	15.2	12.9	11.2

a - Relativo ao do metil 2,3,4,6 - tetra - o - metil - β - D - glucopiranosideo

f - forte m - médio fr - fraco

T A B E L A V

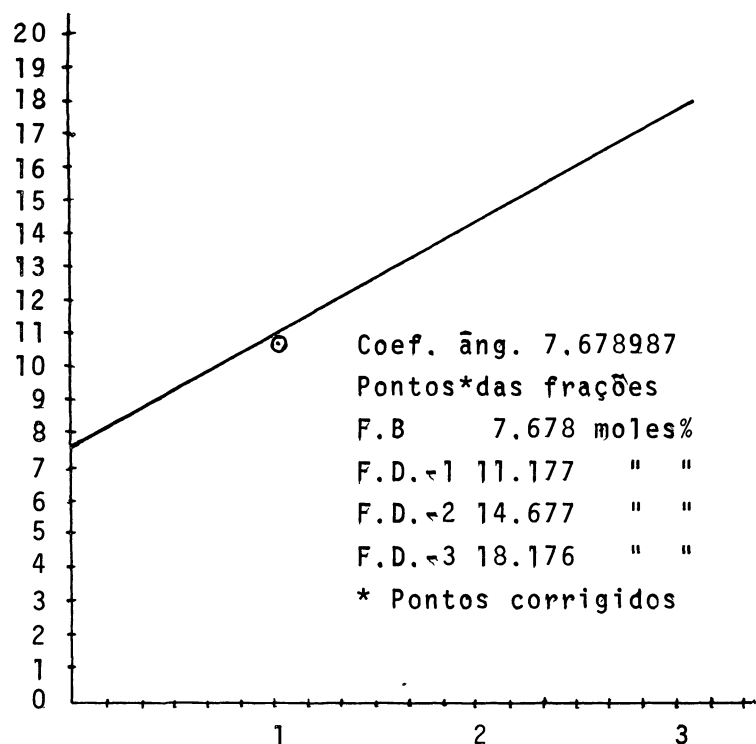
DOSAGEM DE ÁCIDO PIRUVICO E DE 2,6-DI-O-METIL- β -D-GALACTOPIRANOSÍDEO

DEGRADAÇÕES	MOLES POR %			
	ÁCIDO PIRÚVICO ^a		2,6-DI-O-METIL-β-D-GALACTOPIRANOSÍDEO	
	VALORES			
	A ^b	B ^c	C ^b	D ^c
F. B	7.75	7.68	7.70	7.82
F. D. -1	10.80	11.18	10.80	11.19
F. D. -2	15.30	14.67	15.70	14.56
F. D. -3	17.90	18.18	17.30	17.93

a - Ácido pirúvico determinado pelo método enzimático (48) e calculado em moles por % na forma de carboxietilideno, e o 2,6,-di-o-metil- β -D-Galp determinado por G.L.C. nos produtos de metanólise, das frações metiladas F.B, F.D.-1, F.D.-2 e F.D.-3 .

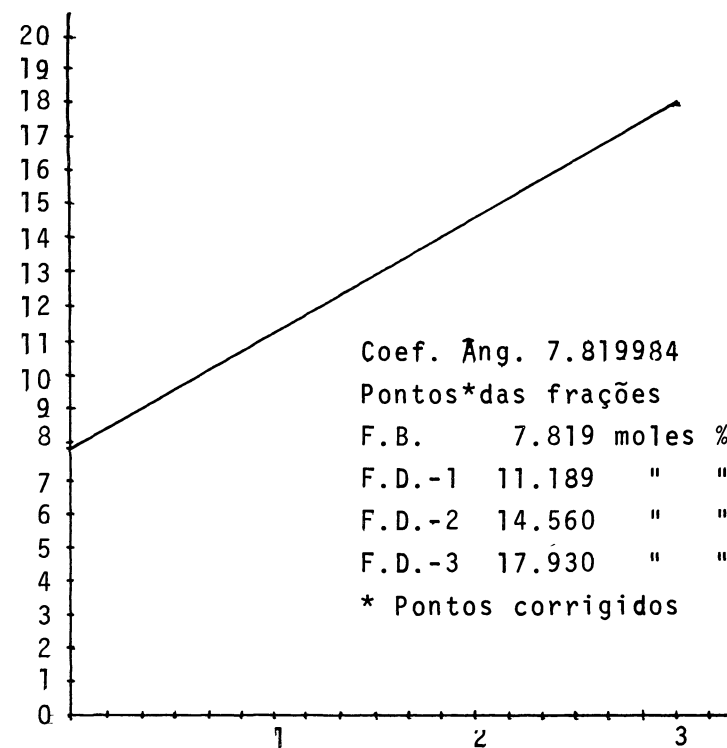
b - Valores experimentais.

c - Valores calculados da curva ajustada, pelo método dos mínimos quadrados (curva traçada pelo - plotter 1627) em computador IBM 1130 do C.C.E. da Universidade Federal do Paraná.



NÚMERO DE DEGRADAÇÕES

FIG:1-Ac. pirúvico determinado pelo método enzimático () e calculado em moles por % na forma de carboxietilideno nas frações F.B (0), F.D.-1 (1), F.D.-2 (2), F.D.-3 (3), obtidas da degradação sequenciada tipo Smith. Curva ajustada pelo método dos mínimos quadrados (curva traçada pelo plotter 1627) em computador IBM 1130 do C.C.E. da U.F.P.



NÚMERO DE DEGRADAÇÕES

FIG.2- 2,6,-di-o-metil-D-galactopiranosídeo determinado por G.L.C. nos produtos de metanólise das frações metiladas F.B. (0), F.D.-1 (1), F.D.-2 (2), F.D.-3 (3), obtidas da degradação sequenciada tipo - Smith. Curva ajustada pelo método dos mínimos quadrados (curva traçada pelo plotter 1627) em computador IBM 1130 do C.C.E. da U.F.P.

- 1) Não foi observado diferenças apreciáveis entre as frações-F.A e F.B, isoladas da massa de ovos de *Ampullarius sp.* (Recife, Pe.).
- 2) As unidades de D-galatose ligadas a piruvato não se encontram situadas em extremidades não redutora do polímero investigado (F.B).
- 3) Os dados analíticos da degradação sequenciada tipo Smith , indicam para o polímero F.B. uma cadeia linear do tipo 3 (1-3) e onde se ligam cadeias ramificadas de diferentes tipos.

- AGRADECIMENTOS -

Ao Prof. Dr. José Hazencleve Duarte, pelo apoio e dedicação - necessários para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. J.K.N. Jones (Queen's University-Kingston Canadá) pela colaboração através de seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Teodor Pilownic, Chefe do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pelotas, pelo apoio e incentivo sempre encontrados em sua pessoa.

A Universidade Federal de Pelotas, através de seu Magnífico - Reitor, Prof. Dr. Delfim Mendes Silveira, pela oportunidade proporcionada.

A Universidade Estadual de Maringá, pelos espectros de Infra-Vermelho (I.V.)

Ao Centro de Computação Eletrônica da Universidade Federal do Paraná e ao acadêmico Augusto Flávio Rabela Duarte, pelas curvas ajustadas em computador.

A todos os amigos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração e incentivo tão necessários durante estes três anos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela ajuda financeira. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) Projetos Nºs 7495/75 (SIP-08-106) e 5218/76, e ao BNDE/FUNTEC (projeto nº 158).

- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -

- 01 - MAY, F. Beitrag zur des tierischen Z. *Biol.*, 97: 215-220, 1931.
- 02 - MAY, F. and WEILAND, H. Darstellung Von L-galaktose aus galaktogen
Z. Physiol. Chem., 296: 154-156, 1954.
- 03 - WEILAND, H. Beobachtungen bei der saurenhydrolyse des galaktogens
II. Mitteil.: Isolierung und nachweis der aufgefundenen disac-
charide 3- β -D- galaktose und 6- β - D-galaktosido-D-galaktose -/
und 6- β -D-galaktosido-D-galaktose mit spuren 6- β -L-galaktosido-
D-galaktose. *Z. Physiol. Chem.*, 305: 87-96, 1956.
- 04 - MAY, F. and WEILAND, H. Beobachtungen bei der saurehydrolyse des
galaktogens, III - Mitteil.: Nachweis der β -D-1-3-bindung als
hauptkettenbindung in tri-und pentasacchariden Hoppe-Seyler's.
Z. Physiol. Chem., 305: 207-219, 1956.
- 05 - HOND A, N.K. Estudo dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise -
ácida parcial do galactano isolado da glândula de albúmen de
Megalobulinus paranaguensis, Tese de mestrado apresentada ao
Departamento de Bioquímica da U.F.P., 1973.
- 06 - FEIJÓ, M.A.L. and DUARTE, J.H. Some structural studies on the fu
cogalactan from egg masses of the snail *Ampullarius* sp., *Carbo*
hyd. Res., 44: 241-249, 1975.
- 07 - DUARTE, H.S. Alguns aspectos estruturais do polissacarídeo da -
glândula de albúmen de *Ampullarius* sp., (Recife Pe.). Tese
de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da U.F.-
Pr., 1976.

- 08 - BORGES, E.A. Estudo estrutural sobre galactano ácido isolado da glândula de albúmen de *Ampullarius sp.*, (Sto. Antônio da Platina,, Pr.).
- 09 - O'COLLA, P. The application of the Barry degradation to snail - Galactogen. *Proc. R. I. A. Sect. B.*, 55: 165-170, 1953.
- 10 - FEIJÓ, M.A.L. Comunicação pessoal.
- 11 - KOCHETKOV, N.K., DMITRIEV, S.A. and BACKINOWSKY, L.V. New sugars from antigenic lipopolysaccharides of bacteria: Identification and synthesis of 3-O- [(R)-1-carboxyethyl]-L-RHAMNOSE, an acidic component of *Shigella dysenteriae* type 5 lipopolysaccharide, *Carbohydr. Res.*, 51: 229-237, 1976.
- 12 - LINDBERG, B. et al. 4-O- [(S)-1-carboxyethyl]-D-glucose: a component of the extracellular polysaccharide material from *Aerococcus viridans* var. *homari*. *Carbohydr. Res.*, 51: 287-290, 1976.
- 13 - DUARTE, J.H. and JONES, J.K.N. Some structural studies on the galactan from the albumen glands of the snail *Strophocheilus oblongus*. *Carbohydr. Res.*, 16: 327-335, 1971.
- 14 - DUARTE, J.H. e MORETTO, M.I. Estudos estruturais em galactano de *Biomphalaria glabrata*. *Ciência e Cultura*, 1972.
- 15 - SEGURA, E.D. e DUARTE, J.H. Methylation studies of the polysaccharides resulting from sequential Smith-degradation of the galactan from the snail *Strophocheilus oblongus*, in press.

- 16 - BALDWIN, E. and BELL, D.J. A preliminary investigation of galactigen from the albumen glands of *Helix pomatia*. *J.Chem. Soc.* , 1461-1465, 1938.
- 17 - CORREA, J.B., DMYTRACZENKO, A., and DUARTE. J.H. Structure of a galactogen found in albumen glands of *Biomphalaria glabrata*. - *Carbohydr. Res.*, 3: 445-452, 1967.
- 18 - DULMAN, W.F. and BISHOP, C.T. Electrophoresis of dried polysaccharides on cellulose acetate, *Can. J. Chem.*, 46: 3079-3084, 1968.
- 19 - SAWARDREKER, J.S., SLONERKER, J.H. and JEANES, A. Quantitative - determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas chromatography. *Anal.Chemistry.*, 37: 1602-1604, 1965.
- 20 - STPHEN, A.M., KAPLAN, M., TAYLOR, G.L. and LEISEGANE.C. Aplicati-on of gas-liquid chromatography to the structural investigati-on of polysaccharides. *Tetrahedron Supplement.*, 7: 223-240, - 1966.
- 21 - TREVELYAN. W. E., PROCTER, D.P. and HARRISSON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms by the use of dipping reagents . *Nature.* 166: 444-445, 1950.
- 22 - JONES, J.K.N. and WALDMAN, W.H. Quantitative analyses of mixtu - res of sugars by the methods of partition chromatografy. Part

- V: Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatography. *J. Chem. Soc.*, 1702-1706, 1950.
- 23 - DUBOIS, M., GILLES, K.A., ROBERS, P.A., and AMITH, F. Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. - *Anal. Chem.*, 28: 350-356, 1952.
- 24 - SOMOGYI, M. Notes on sugars determination, *J. Biol. Chem.*, 195 : 19-23, 1952.
- 25 - LOWRY, O.H. et al. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- 26 - VASKOVSKY, V. E. and ISAY, S.V. Quantitative determination of formaldehyde liberated with periodate oxidation. *Anal. Chem.*, 30 : 25-31, 1969.
- 27 - DISCHE, Z. A. Modification of the carbazole reaction of hexuronic acids for the study of polyuronides. *J. Biol. Chem.* 183: 489 - 494, 1958.
- 28 - ANDERSON, D. M. W., and CREE, G. M. Studies on uronic acid materials. *Carbohydr. Res.*, 5: 385-403, 1968.
- 29 - ANTONOPOULOS, C. A. A modification for the determination of sulphates in mucopolysaccharides by the benidine method. *Acta. Chem. Scand.*, 16: 1521-1522, 1962.

- 30 - BOAS, N. F. Method for the determination of Hexosamines in tissues. *J. Biol. Chem.*, 204: 553-563, 1953.
- 31 - SCHULTZ, T. Determination of the degree of esterification of pectin. Determination of the ester methoxyl content of pectin by saponification and titiation. *Meth. Carbohydr. Chem.*, 5: 189-191, 1965.
- 32 - SEVENNERHOLM, L. Quantitative estimation of sialic acids. *Bioch. Biophys. Acta.*, 24: 604-611, 1957.
- 33 - WARREN, L. Thiobarbituric assay of sialic acids. *Meth. Enz.*, 6: 463-465, 1957.
- 34 - McCOMB, E.A., and McCREADY, C.M. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. *Anal. Chem.*, 29: 819-821, 1957.
- 35 - WOLFROM, M.L., and THOMPSON, A. Acetylation. *Meth. Carbohydr. Chem.*, II: 211-215, 1963.
- 36 - SEVAG, M.B. *Biochem. Z.*, 273: 419-429, 1934.
- 37 - FOSTER, A.B., and OVEREND, W.G. The acidic hydrolysis of O-glycosides. *Chem. Ind. (London)*, 566-567, 1955.
- 38 - KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant Cell-Wall/polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, 5: 340-345, 1967.

- 39 - NEUMÜLLER, G., and VASSEUR, E. The influence of pH periodate oxidation of carbohydrate. *Arkiv. for Kemi.*, 5: 235-245, 1952.
- 40 - ANDERSON S.A., GREENWOOD, C.T., and HIRST, E.L. Physicochemical studies in tarches. Part II - The oxidation of starches by potassium metaperiodate. *J. Chem. Soc.*, 225-231, 1955.
- 41 - HAY, G. W., LEWIS, B.A. and SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: General procedures. *Meth. Carbohydr. Chem.*, 5: 357-377, 1965.
- 42 - HAWORTH, W. N. A new method of preparing alkylated sugars. *J. Chem. Soc.*, 107: 8-16, 1915.
- 43 - HIRST, A. and PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. *Meth. Carbohydr. Chem.*, 5: 287-298, 1965.
- 44 - SANDFORD, P.A. and CONRAD, H.E. The structure of the aerobacter aerogenes A₃ polysaccharides I. A reexamination using improved procedures for methylation analysis. *Biochem.* 5: 1508-1516 1966.
- 45 - PARIKH, V. M. and JONES, J.K.N. Cholla gum, I. Structure of the degraded cholla gum, *Can. J. Chem.*, 44: 327-333, 1966.
- 46 - FRIEDEMANN, T.E. Determination of L-Ketoacids *Meth. in. Enz.*, III : 414-418, 1957.

- 47 - SLOKENES, J.H. and ORENTAS, D.G. Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide. *Nature*, 194: 478 - 479, 1962.
- 48 - KORNBERG, A. Latic desidrogenase of muscle. *Meth.in Enz.*, 1: 441, 1955.
- 49 - CHEN, P.S., Jr., TORIBARA, T. Y., and WARNER, H. Microdetermination of Phosphorus. *Anal. Chem.*, 28: 1756-1758, 1956.
- 50 - SLONEKER, J.H., and ORENTAS, D.G. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas compestris* NRRL B-1459 Part. II linkage of the pyruvic acid. *Can. J. Chem.*, 40: 2188-2189, 1962.
- 51 - COOKE, A., and PERCIVAL, E. Structural investigations of the extracellular polysaccharides elaborated by *Beijerinckia mobilis*. *Carbohydr. Res.*, 43: 117-132, 1975.
- 52 - MELTON; L.D., MINDT, L., REES, D.A. and SANDERSON, G.R. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*; Evidence from partial hydrolysis studies. *Carbohydr. Res.* 46: 245-257, 1976.